



## Lungebetændelse hos mink med ansamlinger af mononukleære inflammationsceller

**Hansen, Mette Sif; Krog, Jesper Schak; Hjulsager, Charlotte Kristiane; Chriél, Mariann; Larsen, Lars Erik; Kokotovic, Branko**

*Published in:*  
Faglig årsberetning 2016 : København Fur

*Publication date:*  
2017

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link back to DTU Orbit](#)

*Citation (APA):*  
Hansen, M. S., Krog, J. S., Hjulsager, C. K., Chriél, M., Larsen, L. E., & Kokotovic, B. (2017). Lungebetændelse hos mink med ansamlinger af mononukleære inflammationsceller. In *Faglig årsberetning 2016 : København Fur* (pp. 113-119). København Fur.

---

### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

## Lungebetændelse hos mink med ansamlinger af mononukleære inflammationsceller

Mette Sif Hansen<sup>1</sup>, Jesper Schak Krog<sup>1</sup>, Charlotte Kristiane Hjulsager<sup>1</sup>, Mariann Chriél<sup>1</sup>, Lars Erik Larsen<sup>1</sup> & Branko Kokotovic<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet, Bülowsvej 27, 1870 Frederiksberg C, Danmark

<sup>2</sup>Statens Serum Institut, Artillerivej 5, 2300 København S, Danmark

### Sammendrag

Ved histologisk undersøgelse af lungevæv fra mink indsendt til diagnostisk undersøgelse på DTU-Veterinærinstituttet bliver der regelmæssigt påvist ansamlinger af mononukleære inflammationsceller især omkring blodkar (cuffings) og ved bronkier. Hos andre dyrearter ses lignende lungeforandringer ved virus- og mycoplasma-infektioner. I 2014 blev der igangsat et projekt, der skulle se nærmere på disse lungeforandringer og dermed udvide kendskabet til lungebetændelse hos mink. Ved histologisk undersøgelse af 45 mink (3 unge hanner, 3 unge tæver og 3 gamle tæver fra 5 farme), blev der fundet kroniske lungeforandringer med ansamlinger af mononukleære inflammationsceller omkring blodkar og bronkier i hovedparten af minkene. Ved elektronmikroskopisk undersøgelse af 16 lungeprøver fandtes ingen virus partikler, derimod fandtes mycoplasma-lignende organismer i alle prøverne. Ved de efterfølgende undersøgelser, dyrkning, PCR og NGS var det ikke muligt at få bekræftet tilstedeværelsen af organismen i prøverne. Undersøgelserne kan bekræfte at cuffing-syndromet er vidt udbredt hos mink, men det er fortsat uklart om det forårsages af specifikke mikroorganismer eller om der er tale om et uspecifikt respons på lungeinflammation.

**Hansen, M.S., Krog, J. S., Hjulsager, C. K., Chriél, M., Larsen, L.E. & Kokotovic, B. 2017.** Lungebetændelse hos mink med ansamlinger af mononukleære inflammationsceller. Faglig Årsberetning 2016, 113-119. København Forskning, Agro Food Park 15, DK-8200 Aarhus N, Danmark.

### Abstract

Accumulations of mononuclear inflammatory cells especially around blood vessels (cuffings) and bronchi are often seen in the lungs of mink submitted for diagnostic examination at the National Veterinary Institute, DTU. In other animal species similar lung lesions are caused by viral- and mycoplasma infections. In 2014, a project was launched to look into the cause of these pulmonary changes and thus broaden the knowledge of pneumonia in mink. Histological examination of 45 sampled mink (3 young males, 3 young females and 3 old females from 5 farms) revealed chronic non-suppurative pneumonia with accumulation of mononuclear inflammatory cells around blood vessels and bronchi in the majority of the mink. No virus particles were detected by electron microscopic examination of 16 lung samples, but organisms having mycoplasma-like morphology were seen in all samples. However, the following examinations by cultivation, PCR and NGS could not confirm the presence of microorganisms in the samples. The study confirms that the cuffing-syndrome is widespread in mink, but it remains unclear whether it is caused by specific microorganisms or if it is a nonspecific response to lung inflammation.

**Hansen, M.S., Krog, J. S., Hjulsager, C. K., Chriél, M., Larsen, L.E. & Kokotovic, B. 2017.** Non-suppurative pneumonia in mink. Annual Report 2016, 113-119. Copenhagen Research, Agro Food Park 15, DK-8200 Aarhus N, Denmark.

**Keywords:** mink, non-suppurative pneumonia

### Indledning

Ved histologisk undersøgelse af lungevævet fra mink indsendt til diagnostisk undersøgelse på DTU-Veterinærinstituttet (DTU-VET) bliver der regelmæssigt påvist ansamlinger af mononukleære inflammationsceller især omkring blodkar (cuffings) og ved bronkier, uden forandringer i andre

organer. Årsagerne til indsendelse af mink varierer, dvs. der er ikke en fælles sygdomshistorie om luftvejslidelser. Ved indsendelse af flere mink fra samme farm ses forandringerne typisk i flere dyr, men af varierende udbredelse og omfang. De makroskopiske obduktionsfund er uspecifikke og supplerende bakteriologiske undersøgelser af lungevævet er oftest

uden resultat. Mink er normalt negative for antistoffer mod plasmacytosevirus (AMDV), men enkelte mink har netop været indsendt til diagnostisk undersøgelse på grund af en atypisk reaktion i CIEP-testen. Dette tyder på at syndromet kan give differentialdiagnostiske problemer i forhold til AMDV. Det har ikke været muligt at identificere årsagen til de perivaskulære ansamlinger i lungen ved DTU-VET's standard laboratorie undersøgelser. I 2014 blev der igangsat et projekt, der skulle se nærmere på disse lungeforandringer og dermed udvide kendskabet til lungebetændelse hos mink.

Hos andre dyrearter ses ansamlinger af mononukleære celler omkring blodkar og bronkier oftest ved virusinfektioner, såsom influenza hos mus og primater (Nakayama *et al.*, 2016; Randall, 2010) og maedi visna infektion hos får (Watt *et al.*, 1992), samt ved mycoplasma infektion hos fitter, mus og gris (Kiupel *et al.*, 2012; Randall, 2010; Sarradell *et al.*, 2003). Yderligere er infektion med *Mycoplasma mustelae* tidligere påvist hos raske minkhvalpe (Salih *et al.*, 1983) og fitter med alvorlig lungebetændelse (Kiupel *et al.*, 2012). Desuden er tilsvarende lungeforandringer beskrevet ved allergiske reaktioner, herunder udsættelse for svampesporer (Randall, 2010).

Lungeforandringerne er ikke tidligere beskrevet til bunds hos mink, men baseret på kendskabet til andre dyrearter formodes det, at der ligeledes kan være tale om infektion med virus eller mycoplasmer.

### Materiale og metoder

Baseret på gennemgang af diagnostiske undersøgelser fra 2012 og 2013, hvor lungeforandringerne var blevet påvist, blev 7 farme (alle fra Jylland) udvalgt. Fra hver af disse farme blev der i foråret 2014 indsamlet 3 mink og ved histologisk undersøgelse af lungevævet blev forandringerne genfundet i varierende

grad på alle farmene. Fem af disse farme blev udvalgt og fra hver farm blev der i efteråret 2014 indsamlet 9 mink (3 unge hanner, 3 unge tæver, 3 gamle tæver, n=45). Så vidt muligt blev der indsamlet dyr der var utrivelige, uden hensyntagen til pelsfarve. Desuden blev der i foråret 2015 indsamlet 3 minkhanner fra 3 sjællandske farme (n=9), hvor lungeforandringerne ikke var påvist i 2012-2014.

Der blev undersøgt for AMDV infektion på blodprøver ved CIEP-test på Kopenhagen Diagnostik, Glostrup, Danmark.

Følgende vævsprøver blev udtaget til histologi; lunge, lever, milt, nyre, tarm (duodenum og ileum). Endvidere blev lungevæv udtaget og frosset ved -80 °C. Vævsprøverne blev fikseret i formalin, paraffinindstøbt, snittet i 5 µm og farvet med hæmatoxylin og eosin. Cuffings i lungevævet blev scoret semikvantitativt som; ingen cuffings, milde til moderate cuffings eller moderate til udtalte cuffings.

Seksten lunger blev undersøgt ved elektronmikroskopi med negativ farvning på "Animal and Plant Health Agency" (APHA), Surrey, England.

Der blev lavet yderligere undersøgelser (mycoplasma dyrkning, PCR-analyse og next generation sekventering (NGS)) på udvalgte lungeprøver med udtalte histologiske lungeforandringer.

### Resultater

Alle mink var negative for AMDV i CIEP-testen. Ved obduktion af minkene indsamlet i efteråret 2014 (n=45), fandtes ingen specifikke fund. Dyrene var velnærede med upåfaldende lunger. Mange mink havde varierende grader af fedtlever, andre fund var sår (n=4), næseflåd (n=1), nodulær milt (n=2) og nyresten (n=1).

Ved de histologiske undersøgelser, blev der fundet kroniske lungeforandringer med

ansamlinger af mononukleære inflammationsceller omkring blodkar og bronkier i hovedparten af minklungerne fra alle 5 farme og i alle 3 grupper (unge hanner, unge tæver og gamle tæver) (Tabel 1). Der var ingen tydelig forskel mellem grupperne, dog var andelen af unge hanner uden cuffs højere sammenlignet med de andre grupper og de gamle tæver havde generelt en højere forekomst af cuffs. Der fandtes forskellige typer af mononukleære inflammationscelle-ansamlinger i lungerne i form af cuffs omkring blodkar, der kunne være af en diffus type (Figur 1) eller nodulær type (Figur 2), samt forstørrelse af det bronkiøle-associerede lymfoide væv

(BALT), der overvejende var en nodulær reaktion (Figur 3).

Andre histologiske lungfund var interstitiel lungebetændelse (inflammation i hinderne mellem alveoler), suppurativ lungebetændelse (pus i alveoler) eller suppurativ bronkitis (pus i bronkier) (Tabel 2). Generelt var der tale om lokale, milde forandringer. Andelen af unge hanner og tæver med "andre lungeforandringer end cuffs" var højere i forhold til gruppen af gamle tæver. Der var ingen entydig sammenhæng mellem tilstedeværelsen af cuffs og forekomst af interstitiel lungebetændelse, suppurativ lungebetændelse eller suppurativ bronkitis.

**Tabel 1. Antallet af mink med ansamlinger af mononukleære inflammationsceller omkring blodkar (cuffs) i lungerne i grupperne af hhv. unge hanner, unge tæver og gamle tæver.**

Gruppe	Ingen cuffs	Mild-moderat cuffs	Moderat-massiv cuffs
Unge hanner	43 % (6/14)	14 % (2/14)	43 % (6/14)
Unge tæver	21 % (3/14)	43 % (6/14)	36 % (5/14)
Gamle tæver	14 % (2/14)	50 % (7/14)	36 % (5/14)
Total	26 % (11/42)	36 % (15/42)	38 % (16/42)

**Tabel 2. Antallet af mink med andre histologiske forandringer end cuffs i lungerne i grupperne af hhv. unge hanner, unge tæver og gamle tæver.**

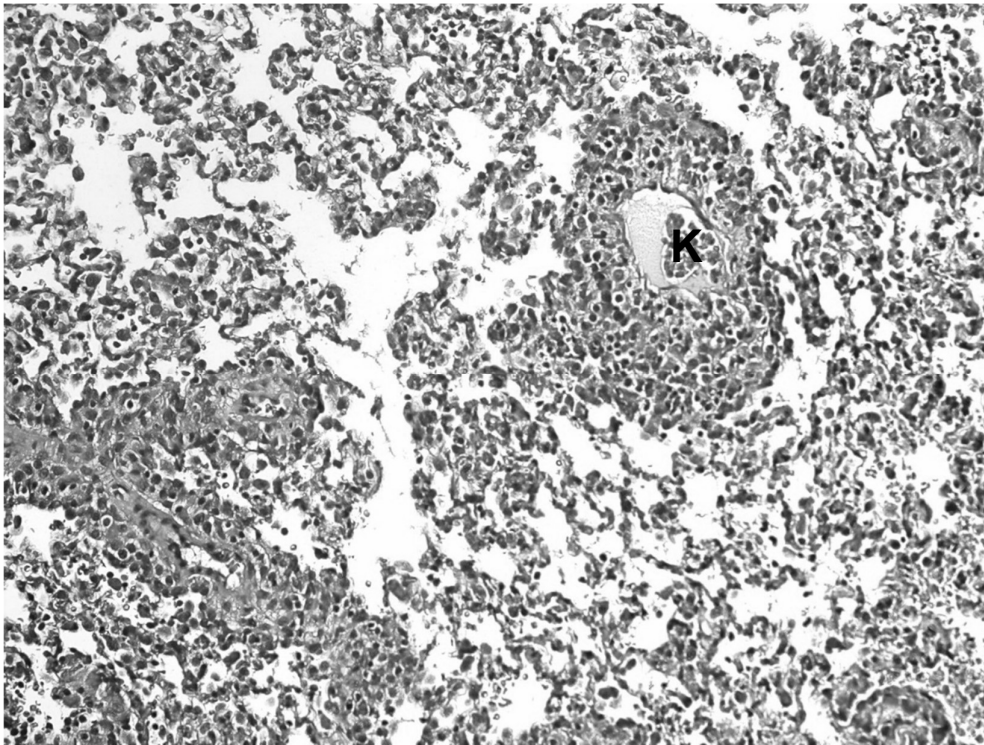
Gruppe	Interstitiel <sup>1</sup> lungebetændelse	Suppurativ <sup>2</sup> lungebetændelse	Suppurativ <sup>2</sup> bronkitis	Total
Unge hanner	29 % (4/14)	29 % (4/14)	43 % (6/14)	100 % (14/14)
Unge tæver	50 % (7/14)	29 % (4/14)	21 % (3/14)	100 % (14/14)
Gamle tæver	36 % (5/14)	0 % (0/14)	21 % (3/14)	57 % (8/14)
Total	38 % (16/42)	19 % (8/42)	29 % (12/42)	

<sup>1</sup>Interstitiel: inflammationsreaktion i hinderne mellem alveoler.

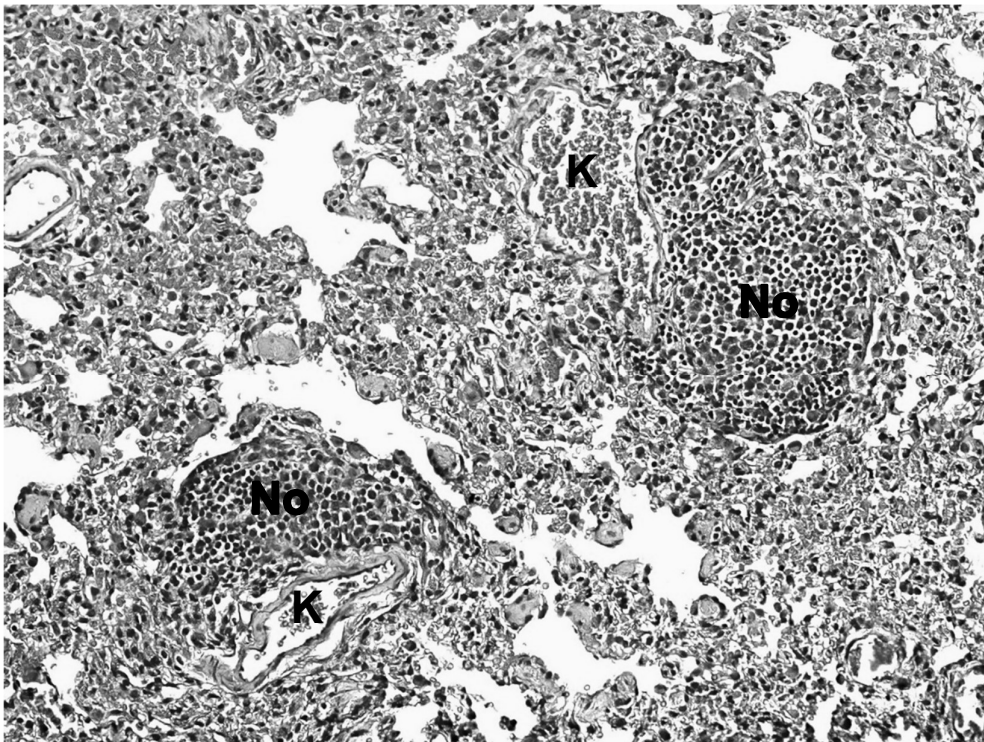
<sup>2</sup>Suppurativ: infiltration af pus-dannende inflammationsceller (neutrofile granulocytter).

Andre histologiske fund var varierende grader af fedt ophobning i levercellerne/ fedtlever hos alle mink, samt tegn på bakteriel tarmbetændelse i 6 mink, hvoraf 3 kom fra den samme farm. Desuden havde én mink coccidier.

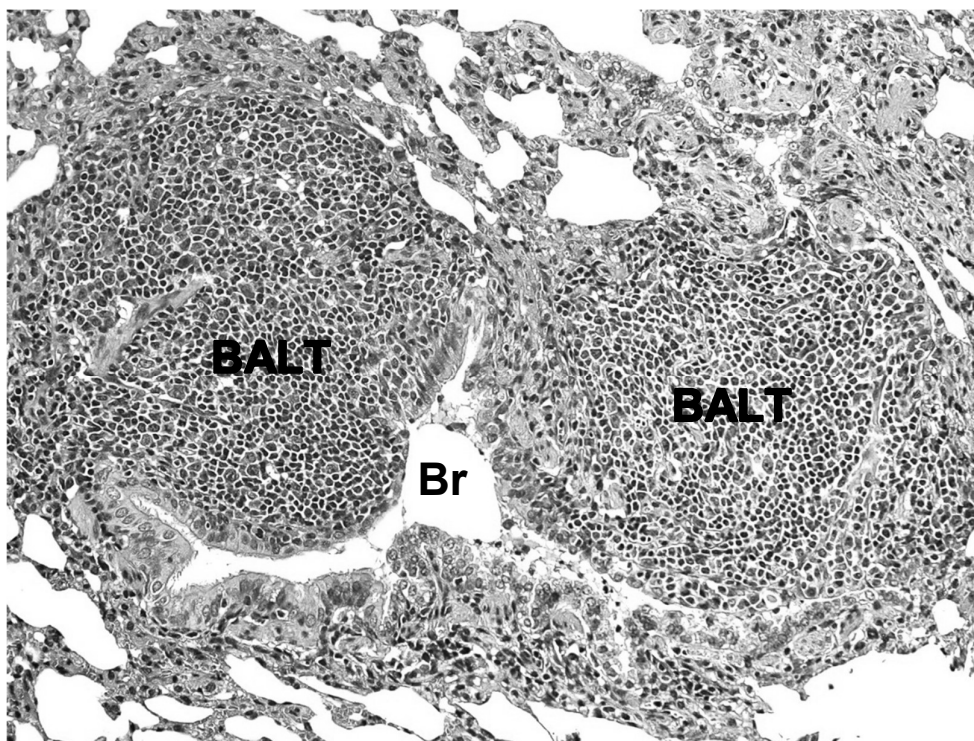
Ved obduktion af hanmink indsamlet i foråret 2015 (n=9) fandtes dyrene af normalt huld og lungerne var upåfaldende. Ved den histologiske undersøgelse fandtes varierende grader af cuffs i lungerne. Der blev ikke påvist andre histologiske læsioner.



Figur 1: Udsnit af minklunge med diffuse ansamlinger af mononukleære inflammationsceller omkring et blodkar (K).



Figur 2: Udsnit af minklunge med nodulære ansamlinger af mononukleære inflammationsceller (No) i forbindelse med blodkar (K).



Figur 3: Udsnit af minklunge med nodulær forstørrelse af det bronkiolo-associerede lymfoide væv (BALT) i forbindelse med en sammenpresset bronkiolo (Br).

Ved elektronmikroskopisk undersøgelse af 16 lungeprøver indsamlet i efteråret 2014 fandtes ingen virus partikler, derimod fandtes mycoplasma-lignende organismer i alle prøverne (Figur 4). De efterfølgende undersøgelser af udvalgte lungeprøver med dyrkning, PCR og NGS kunne ikke bekræfte tilstedeværelsen af mycoplasmer i prøverne.

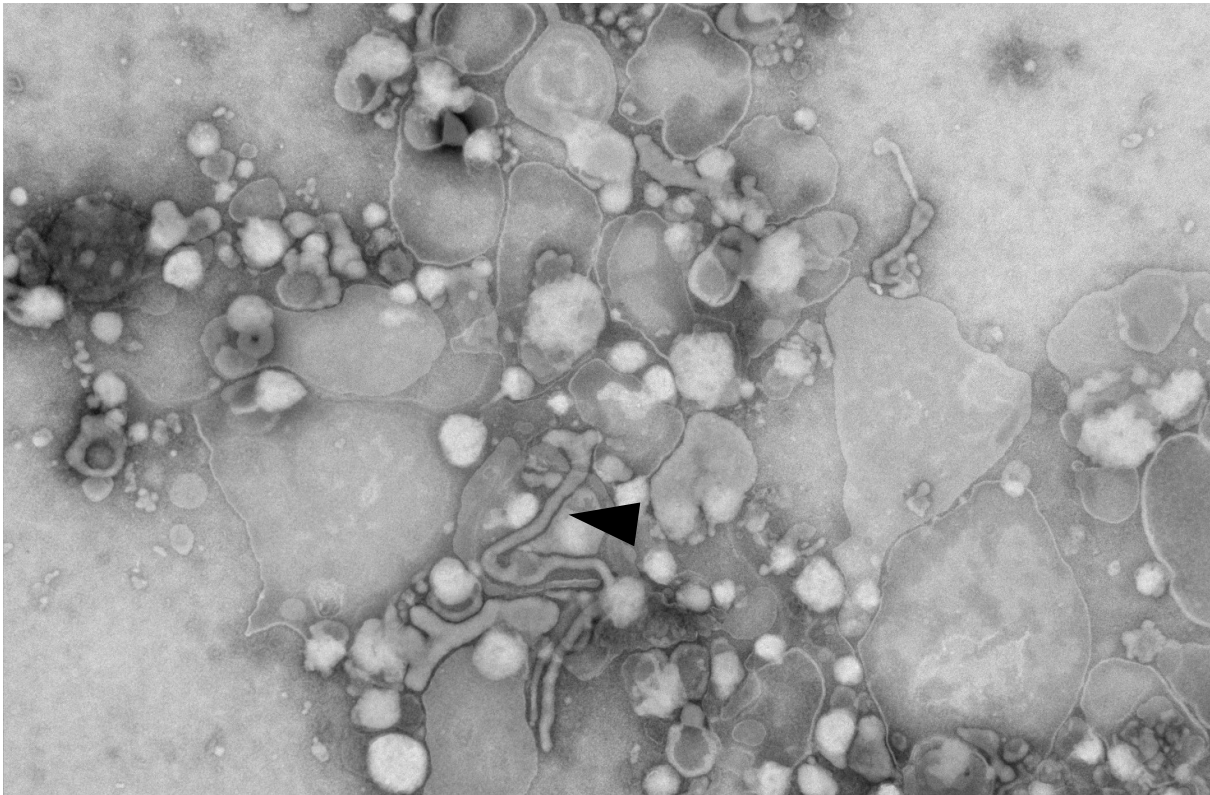
### Diskussion og konklusion

Lungerne fra minkhannerne fra de sjællandske farme, der tidligere havde været fri for cuffings, viste sig at have lungeforandringer svarende til dem, der blev fundet på de andre farme, hvilket indikerer at tilstanden er udbredt.

I lungerne hos alle mink blev der fundet en diffus- og en nodulær type cuffing, hvilket kan afspejle forskelle i varigheden af en infektion/stimulering eller måske kan

skyldes forskellige reaktionsmønstre ved forskellige stimuli. Desuden fandtes reaktion i lungernes BALT, som man ikke kender så meget til hos mink. Bl.a. er det uklart om BALT allerede er tilstede ved minkhvalpens fødsel, som det er tilfældet hos gris, eller om BALT først induceres ved infektion/stimulering, som det er beskrevet hos mus og menneske (Randall, 2010).

Efter fund af mycoplasma-lignende organismer ved elektronmikroskopi blev der foretaget yderligere undersøgelser med henblik på at få bekræftet tilstedeværelse af mycoplasmer i prøverne. I første omgang blev prøverne undersøgt ved dyrkning i klassiske mycoplasma dyrkningsmedier som tidligere med succes er blevet anvendt til dyrkning af mycoplasma fra mink



Figur 4: Minklunge med mycoplasma-lignende organisme (pilehoved) undersøgt ved elektronmikroskopi.

Desuden blev der foretaget PCR undersøgelser med primers som er specifikke for bakteriel 16S rRNA gener. Ingen af undersøgelserne gav et resultat som kunne bekræfte tilstedeværelse af mycoplasma i prøverne. Udvalgte lungeprøver blev også undersøgt med NGS, men pga. vanskeligheder med at oprense tilstrækkelig mængde af DNA/RNA fra prøverne var det ikke muligt at få brugbare sekvenser til bioinformatisk analyse - selv efter anvendelse af "Whole transcription amplification". Som følge heraf er det for nuværende ikke muligt at give et entydigt svar på hvilke mikroorganismer, der er observeret i lungeprøverne ved elektronmikroskopi.

Der er flere mulige årsager til at det ikke lykkedes at få identificeret organismene i lungeprøverne. For eksempel, hvis antallet af levende mycoplasma var lavt ved prøveindsamlingen, vil det påvirke både dyrkning og PCR-undersøgelse negativt. I vores dyrkningsforsøg har vi

anvendt det mest almindelig mycoplasma vækstmedie, som ikke nødvendigvis er tilstrækkelig til arter med særlige krav. Således vil et målrettet dyrkningsforsøg kræve brug af både en tilstrækkelig mængde af prøvemateriale og en række af udvalgte medier for at dyrke mycoplasma. Mangelfulde resultater i forbindelse med PCR og NGS kan endvidere være forårsaget af nedbrydelse af celleindhold i prøverne. For at forhindre eller minimere dette vil det være fordelagtigt at anvende fersk eller hensigtsmæssigt konserveret materiale, samt at optimere DNA/RNA oprensningsprocedurer.

Undersøgelserne kan bekræfte at cuffing-syndromet er vidt udbredt, men det er fortsat uklart om det forårsages af specifikke mikroorganismer eller om der er tale om et uspecifikt respons på lungeinflammation, hvor infektion med flere mikroorganismer og/eller miljøpåvirkninger kan føre til cuffing-dannelse.

## **Referencer**

Kiupel, M., Desjardins, D.R., Lim, A., Bolin, C., Johnson-Delaney, C.A., Resau, J.H., Garner, M.M. & Bolin, S.R. 2012. Mycoplasmosis in ferrets. *Emerging infectious diseases*, 18: 1763-1770

Nakayama, M., Ozaki, H., Itoh, Y., Soda, K., Ishigaki, H., Okamatsu, M., Sakoda, Y., Park, C., Tsuchiya, H., Kida, H. & Ogasawara, K. 2016. Vaccination against H9N2 avian influenza virus reduces bronchus-associated lymphoid tissue formation in cynomolgus macaques after intranasal virus challenge infection. *Pathology International*, 66: 678–686

Randall, T. D. 2010. Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (BALT): Structure and Function. In: *Advances in Immunology, Mucosal Immunity*, Volume 107. Eds.: Fagarasan, S. & Cerutti, A. Elsevier Inc. ISSN 0065-2776, DOI: 10.1016/S0065-2776(10)07002-1.

Salih, M.M., Friis, N.F., Arseculeratne, S.N., Freundt, E.A. & Christiansen, C. 1983. *Mycoplasma mustelae*, a new species from mink. *International journal of systemic bacteriology*, 33: 476-479

Sarradell, J., Andrada, M., Ramírez, A.S., Fernández, A., Gómez-Villamandos, J.C., Jover, A., Lorenzo, H., Herráez, P. & Rodríguez, F. 2003. A Morphologic and Immunohistochemical Study of the Bronchus-associated Lymphoid Tissue of Pigs Naturally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Pathol*, 40: 395–404

Watt, N.J., Macintyre, N., Collie, D., Saragan, D. & McConnell, I. 1992. Phenotypic analysis of lymphocyte populations in the lungs and regional lymphoid tissue of sheep naturally infected with maedi visna virus. *Clin exp Immunol*, 90: 204-208